Arbeiten aus dem
Hygienischen Institut der Kgl. Tierärztlichen Hochschule zu Berlin.
Leiter: Professor Dr. med. Ostertag.
No. XI.

Untersuchungen

über

Sporulation der Milzbrandkeime und ihre Bedeutung für die Nachprüfung der Milzbranddiagnose.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der vereinigten medizinischen Fakultät

der

Großherzoglich-Hessischen Ludwigs-Universität zu Gießen

vorgelegt von

Reinhold Eberle,
Tierarzt aus Ulm a./D.

BERLIN 1907.
Verlagsbuchhandlung von Richard Schoetz,
Wilhelmstraße 10.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154004_0274

Arbeiten aus dem
Hygienischen Institut der Kgl. Tierärztlichen Hochschule zu Berlin.
Leiter: Professor Dr. med. Ostertag.
No. XI.

Untersuchungen

über

Sporulation der Milzbrandkeime und ihre Bedeutung für die Nachprüfung der Milzbranddiagnose.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der vereinigten medizinischen Fakultät

der

Großherzoglich-Hessischen Ludwigs-Universität zu Gießen

vorgelegt von

Reinhold Eberle,
Tierarzt aus Ulm a./D.

BERLIN 1907.
Verlagsbuchhandlung von Richard Schoetz,
Wilhelmstraße 10.

Gedruckt mit Genehmigung der vereinigten medizinischen Fakultät der Universität Gießen.

Referent: Professor Dr. Olt.

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

Der einwandfreie Nachweis des Milzbrandes hat wegen der sanitäts- und veterinärpolizeilichen Konsequenzen, die sich an die Fesstellung dieser Seuche knüpfen, eine erhebliche praktische Bedeutung.

Seit der Erforschung der Biologie des Milzbranderregers durch Robert Koch ist es für notwendig erachtet worden, die auf den pathologisch-anatomischen Befund gestützte Diagnose durch den bakteriologischen Nachweis der Erreger sicher zu stellen. Die bakteriologische Untersuchung vergrößerte aber zunächst die Schwierigkeiten, statt sie zu verringern, da sie sich in der Hauptsache auf den färberischen Nachweis der Milzbrandbazillen beschränkte, und es sich herausstellte, daß es den Milzbrandbazillen ähnliche Stäbchen gibt, die sogenannten Kadaverbazillen. Letztere aus dem Darme stammend, treten in den Körper der gestorbenen Tiere über, wenn die Kadaver eine Zeit lang uneröffnet gelegen haben.

Da entdeckte Johne (1) an den Milzbrandbazillen eine durch eine besondere Färbemethode darstellbare Kapsel; nunmehr glaubte man in der Lage zu sein, jeden Milzbrandfall auf Grund eines gefärbten Ausstrichpräparates mit Sicherheit erkennen zu können.

Diese Annahme bestätigte sich jedoch nicht; denn die Darstellbarkeit der Kapsel an den Milzbrandbazillen in dem Kadaver nach dem Verfahren Johnes erwies sich von begrenzter Dauer. Daran änderten auch die Versuche, das Johnesche Färbeverfahren zu verbessern, nichts. Die Ansichten stimmen vielmehr jetzt darin überein, daß die Färbung eines Ausstrichpräparats und die mikroskopische Untersuchung des gefärbten Präparats für sich allein zur Fesstellung der Milzbranderreger

und somit des Milzbrandes nicht in allen Fällen ausreichend sind, weil eine spezifische und absolut sichere Färbemethode für Milzbrand nicht existiert, Lüpke (2).

Zur Kontrolle und Ergänzung der Untersuchung gefärbter Ausstrichpräparate kamen bald zwei weitere bakteriologische Hilfsmittel in Anwendung: die Impfung und die Kultur. Namentlich letztere, auf die gelegentlich von Fränkel (3) hingewiesen, und deren große Bedeutung für den Milzbrandnachweis bei Tieren durch verschiedene Publikationen des hygienischen Instituts der Berliner tierärztlichen Hochschule, Bongert (4), Kaestner (5), dargetan wurde, spielt jetzt bei der bakteriologischen Sicherung der Milzbranddiagnose die ihr gebührende Rolle. Man wird aber Ostertag (6) zustimmen müssen, wenn er sagt, daß zur Gewinnung eines absolut sicheren Ergebnisses bei der Milzbranddiagnose sämtliche uns zur Verfügung stehenden Hilfsmittel des Nachweises in Anwendung gebracht werden müssen: das Mikroskop, die Kultur und der Tierversuch.

Kultur und Tierversuch lassen sich der Regel nach nur in Laboratorien und Instituten mit den hier zur Verfügung stehenden Einrichtungen und durch die hier vorhandenen geschulten Kräfte ausführen. Deshalb muß Milzbrandmaterial versandt werden. Anfangs schickte man zum Zwecke der bakteriologischen Sicherstellung der Diagnose Organteile oder Blutproben an die Laboratorien und Institute ein. Später bediente man sich außerdem der Einsendung dünner Objektträgerausstriche, Tröster (7). Da durch den Vorgang der Fäulnis an den in den Organteilen und im Blut enthaltenen Milzbrandbazillen Veränderungen eintreten, die ihren Nachweis nicht nur ganz erheblich erschweren, sondern sogar oft ganz unmöglich machen, Fränkel, Bongert und a. (8), der Fäulnisprozeß aber an den dem Kadaver entnommenen Organ- und Blutproben während des Transports und bis zur Verarbeitung fortdauert, und da andererseits der Versand von Milzbrandmaterial in dünnen Objektträgerausstrichen die Kultur und den Tierversuch unmöglich macht, da die Milzbrandbazillen in solchen Ausstrichen durch Austrocknung zu Grunde gehen, Tröster (l. c.), wurden verschiedene andere Versandmethoden in Vorschlag gebracht und praktisch ver-

wendet. So empfahl Olt (9) den Versand auf Kartoffelscheiben, Bongert (l. c.) und Hosang (10) schlugen vor, Blut in dicker Schicht auf Objektträgern zu versenden, Kaestner (l. c.) empfahl das Eintrocknenlassen auf Glas, Wolle und Papier und Fischöder (11) benutzte Tuben von besonderer Beschaffenheit zu diesem Zwecke.

Der Wert der Eintrocknung in dicker Schicht, der durch die Versuche von Bongert, Hosang und Kästner erwiesen ist, beruht nach Ansicht dieser Autoren auf der Konservierung der Milzbrandbazillen.

Ein neues Verfahren, das nach den Angaben des Entdeckers dem der Eintrocknung überlegen ist, ist von der Forsterschen Schule (12 und 12a) — Hygienisches Institut zu Straßburg — in der sogenannten Gipsstabmethode angegeben worden.

Das Straßburger Verfahren beruht auf der Eigentümlichkeit der Milzbrandbazillen, auf der Oberfläche schlechter Nährböden schnell Sporen zu bilden. Wie es Pasteur und Engel (13) schon für die Sporen der Hefepilze erkannt hatten, sind angefeuchtete Gipsstäbe auch für die Sporulation der Milzbrandbazillen ein sehr geeignetes Substrat.

Nach dem Straßburger Verfahren, wie es von Marxer beschrieben wurde, dessen Mitteilungen die Veranlassung zu vorliegender Arbeit waren, werden mit Wasser angefeuchtete Gipsstäbe dünn mit Blut, und zwar erstens aus der Halsvene oder anderen oberflächlichen Venen, zweitens aus der Milz und drittens mit Herzblut milzbrandkranker Tiere bestrichen. Die Gipsstäbe werden bei Zimmertemperatur (18—22° C) vor Licht geschützt aufbewahrt und nach 1 oder 2 Tagen auf die Anwesenheit von Milzbrandkeimen untersucht. Zu diesem Zwecke wird das am Gipsstab haftende Material in ein Bouillonröhrchen vorsichtig abgestrichen, dann a) nach einer 2 Minuten dauernden Erhitzung auf 65° C — wodurch die Abtötung bestimmter verunreinigender Bakterien (B. coli Proteus) angestrebt wird — zur Impfung von 3 Agarröhrchen zwecks Herstellung von Plattenkulturen verwandt; b) nach einer 10 Minuten dauernden Erhitzung auf 65° C, wodurch alle vegetativen Formen abgetötet werden, auf erfolgte Sporenbildung durch Anlegung ebenfalls dreier Agar-

platten untersucht. Gleichzeitig wird das 2 Minuten lang erhitzte Material an eine Maus verimpft. Vordem werden Deckglaspräparate aus dem Ursprungsmaterial angefertigt; auch werden zur Kontrolle aus letzterem Material Plattenkulturen angelegt (Organplatten). Bei allen vergleichenden Untersuchungen lieferten nun die Gipsplatten ein besseres Resultat wie die Organplatten. Von dem Tierversuche konnte in den meisten Fällen Abstand genommen werden, weil sich das Plattenverfahren immer als zuverlässiger erwies, besonders bei älterem Material.

Wie schon erwähnt, ist das Einschicken von einfachen Deckglaspräparaten zur Prüfung, ob Milzbrand vorliegt, nicht ausreichend. Es ist aber auch die Einsendung solchen Materials unzweckmäßig, das während der Dauer des Transports noch Veränderungen eingeht, die die spätere Untersuchung beeinträchtigen oder ganz unmöglich machen, Tröster (l. c.). Aus diesem Grunde ist die Einsendung von Material in feuchtem Zustande nach früherer Art und der Versand in dünnen Objektträgerausstrichen sicherlich nicht zweckmäßig. Nach Ansicht der Straßburger Schule wird letzterer Übelstand am besten beseitigt durch die Umwandlung bazillenhaltigen Materials in sporenhaltiges unter Benutzung von Gipsstäben. Nun ist die Sporulation abhängig von der herrschenden Temperatur und sie tritt in den kälteren Monaten später ein als in den wärmeren oder bleibt ganz aus, wie dies durch die Untersuchungen von Weil (14) hinlänglich erklärt wird. Bei höheren Temperaturen war durch das Zusammenleben von Milzbrandkeimen mit anderen Bakterien der Nachweis nach 2 Monaten nicht mehr möglich (Überwucherung durch Futterbazillen). Am geeignetsten war bei der Gipsstabmethode für die Diagnose eine Aufbewahrung der Gipsstäbe bei einer Temperatur von 18—22° C (Zimmertemperatur). An einem in solcher Weise aufbewahrten Gipsstabe konnten nach 14 Monaten noch Milzbrandkeime nachgewiesen werden. Bei niederen Temperaturen versagte manchmal die Gipsstabmethode, Marxer (l. c.)

Herr Professor Dr. Ostertag, Leiter des hygienischen Instituts der Tierärztlichen Hochschule in Berlin, gab mir die Anregung, das Gipsstabverfahren zum Versand von Milzbrand-

material zwecks bakteriologischer Untersuchung einer Nachprüfung zu unterziehen, nachdem die Mitteilung von Marxer erschienen war*).

Versuchsplan.

Bei der Prüfung der Angaben der Straßburger Schule, daß die Sporenbildung der Milzbrandbazillen auf Gips unter gewissen Bedingungen regelmäßig eintritt, auf ihre Richtigkeit, handelte es sich in erster Linie um die Feststellung, wie man sicher und bequem das Vorhandensein von Milzbrandsporen unter Ausschluß der Milzbrandbazillen nachweisen kann. Eine Handhabe bot sich hierfür in der bekannten Verschiedenheit der Resistenz beider Milzbrandkeimformen gegen bestimmte Temperaturen. Man brauchte somit nur den Zeitpunkt festzustellen, nach dem bei einer bestimmten Temperatur zwar die Milzbrandbazillen mit Sicherheit zugrunde gehen, die Sporen aber noch intakt bleiben. Um hierüber selbst ein Urteil zu gewinnen, stellte ich zunächst Erhitzungsversuche an.

Die weiteren von mir ausgeführten Untersuchungen betrafen die Ermittelung der für die Sporulation des Milzbranderregers erforderlichen Bedingungen außer der Sauerstoffanwesenheit, die als Conditio prima für die Sporulation des Milzbrandbazillus angesehen werden muß. Meine Untersuchungen erstreckten sich daher auch auf:

1. die Prüfung der für die Sporulation günstigsten Materialien, speziell der Gipsstäbe;
2. die Feststellung der für die Sporulation erforderlichen Temperatur;
3. die Prüfung des Verhältnisses der Feuchtigkeit des Versandmaterials sowohl zum Eintritt der Sporulation, als auch zur Erhaltung der Sporulationsfähigkeit der Bazillen, d. h. ihrer

*) Anm.: Inzwischen ist die Abhandlung von Jakobsthal und Pfersdorff (12a) über den gleichen Gegenstand erschienen. Leider konnte ich die Einzelheiten der schönen, ausführlichen Arbeit dieser beiden Autoren nicht mehr genügend berücksichtigen, da ich meine Versuche bereits beendet hatte, als mir genannte Abhandlung in die Hände kam.

Fähigkeit, zu Fäden auszuwachsen und Sporen zu bilden;

4. die Ermittelung des Einflusses der Lichteinwirkung auf die Sporulation der Milzbrandbazillen.

Ausführung der Versuche.

I. Erhitzungsversuche mit bazillen- und sporenhaltigem Milzbrandmaterial.

Bei dem Gipsstabverfahren wird davon ausgegangen, daß eine 2 Minuten dauernde Erhitzung auf 65° C die vegetativen Milzbrandformen nicht schädigt, während die Bakterien der Coli- und Proteusarten zugrunde gehen, ferner daß eine 10 Minuten dauernde Erhitzung auf 65° C die vegetativen Milzbrandformen mit Bestimmtheit abtötet, während die Milzbrandsporen dadurch nicht alteriert werden.

Durch 10 Minuten langes Erhitzen auf 55° C wurde nach Toussaint (15) nur die Virulenz der Milzbrandbazillen etwas abgeschwächt. Nach den Angaben von Chamberland und Roux (16) erfolgte durch trockenes Erhitzen von Milzbrandbazillen auf 55° C deren Abtötung erst nach 40 Minuten. Nach Momont (17) blieb frisches Milzbrandblut bei 50—55° C fast eine Stunde und trockenes Milzbrandblut sogar 2 Stunden keimfähig. Weil (l. c.) hat festgestellt, daß sporenfreie Bouillonkulturen nach Erwärmen auf 65° C in 5½ Minuten, bei 75° C in 3 Minuten und bei 80° C in 1 Minute zugrunde gehen.

Ich beschränkte mich bei meinen Versuchen auf die Prüfung der Tenazität der Milzbrandkeime in flüssigen Medien, da nur solche für meine späteren Versuche in Betracht kamen. Dabei mußten sowohl die Bazillen als auch die Sporen der von mir benutzten Milzbrandkulturen auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Erhitzung untersucht werden, da bekannt war, daß die Sporen verschiedener Milzbrandkulturen gegenüber der Erhitzung verschiedene Resistenz zeigen können. Während einer Zeitdauer von 1—10 Minuten wurden die in Nährbouillon oder physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmten Milz-

brandbazillen in einem Wasserbade von 65° C und während 1—5 Minuten in einem solchen von 70° C erhitzt und nach 1, 2, 3—5 und 10 Minuten durch das Plattenkulturenverfahren darauf untersucht, ob ihre Abtötung erfolgt war.

Dabei stellte es sich heraus, daß sich nicht nur die Tenacität der Milzbrandsporen, sondern auch diejenige der Milzbrandbazillen je nach ihrem Ursprung sehr verschieden verhält. Es waren z. B. bei 65° C schon nach 1 Minute die Milzbrandbazillen aus 2 Fällen und nach 2 Minuten aus 4 Fällen abgetötet, während die aus anderen Fällen stammenden Bazillen diese Erhitzung auf 65° C 3 Minuten und einmal sogar 7 Minuten lang ohne Beeinträchtigung ihres Wachstumsvermögens ertrugen. Erst bei 70° C wurde ohne Unterschied der Herkunft das Absterben der Bazillen nach 1—2 Minuten beobachtet.

Tabelle I.

Erhitzungsversuche mit sporenfreiem Milzbrandmaterial im Wasserbade von 65° und 70° C.

Lfd. No.	Beschaffenheit des Materials	Abtötung bei 65° C.	Abtötung bei 70° C.	Bemerkungen
1.	Frisches Mäuseblut	nach 2 Minuten	nach 1 Minute	Das keimhaltige Material war in Bouillon oder physiologischer Kochsalzlösung suspendiert.
2.	Frisches Mäuseblut	nach 1 Minute	nach 1 Minute	
3.	Frisches Mäuseblut	nach 7 Minuten	nach 2 Minuten	
4.	Frisch. Kaninchenblut	nach 3 Minuten	nach 1 Minute	
5.	Sporenfreie Agarkultur	nach 1 Minute	nach 1 Minute	
6.	Sporenfreie Agarkultur	nach 2 Minuten	nach 1 Minute	
7.	Frisches Rinderblut	nach 3 Minuten	nach 1 Minute	
8.	Frisches Rinderblut	nach 2 Minuten	nach 1 Minute	
9.	ca. 20 Stunden altes Mäuseblut (Gipsabkratzung)	nach 2 Minuten	nach 1 Minute	
10.	ca. 20 Stunden altes Mäuseblut (Pappdeckelabkratzg.	nach 2 Minuten	nach 1 Minute	

Nach Koch und Wolffhügel (18) werden Milzbrandsporen durch trockene Hitze von 140° C nach 3 Stunden abgetötet.

Koch, Gaffky und Löffler (19) stellten fest, daß Wasserdampf von 95° C innerhalb 10 Minuten, Wasserdampf von 100° C innerhalb 5 Minuten die Milzbrandsporen zerstört. Geppert (20) fand Sporen nach 5 Minuten langer Einwirkung von siedendem Wasser noch lebensfähig. Nach Pfeiler (21) können Milzbrandsporen schon bei einer Temperatur von 72—75° C zugrunde gehen, wenn diese 3 Tage lang einwirkt.

Meine Untersuchungen über die Tenazität der Milzbrandsporen wurden nur in flüssigen Medien, gleichwie dies zuvor bei der Prüfung der Bazillenresistenz geschah, ausgeführt. Verwandt wurden Abkratzungen von Gipsstäben, Pappdeckeln und Glasplatten, sowie ältere Bouillonkulturen. Bei Erhitzung auf 65° C blieben die Sporen selbst bei stundenlanger Einwirkung dieser Temperatur keimfähig; bei 70° C hatten diese nach 1½ Stunden, bei 80° C nach einer Stunde und bei 85—90° C nach ¼ Stunde ihre Lebensfähigkeit noch nicht eingebüßt; selbst eine Erhitzung auf 95—100° C ertrugen die Sporen noch bis zur Dauer von 10 Minuten ohne Nachteil. Die Abtötung der von mir benutzten Milzbrandsporen erfolgte erst bei einer ¼ stündigen Erhitzung auf 95—100° C.

Tabelle II.

Erhitzung sporenhaltigen Materials im Wasserbade von 65—100° C.

Zeitdauer nach Minuten und Stunden	Temperaturgrade nach Celsius						
	65	70	80	85	90	95-100*)	
5 Minuten	+	+	+	+	+	+	Zeichenerklärung.
10 Minuten	+	+	+	+	+	+	+ = keine Abtötung
15 Minuten	+	+	+	+	+	—	— = Abtötung der Keime.
20 Minuten	+	+	+	+	+		
30 Minuten	+	+	+	+	—		
50 Minuten	+	+	+	—			
1 Stunde	+	+	+				
1½ Stunden	+	+	—				*) Die durchschnittliche Temperatur in d. letzten Versuchsreihe betrug 98° C.
100 Minuten	+	+					
110 Minuten	+	—					
2 Stunden	+						

Während also die Temperatur von 70° C im Wasserbad die Milzbrandbazillen mit Sicherheit in wenigen Minuten abtötete, wurde die Lebensfähigkeit der Sporen hierdurch erst nach einer Einwirkungsdauer von 110 Minuten zerstört. Man kann also ohne jegliche Besorgnis, die Lebensfähigkeit der Sporen zu vernichten, das Material 10 Minuten lang auf 70° C erhitzen. Dagegen reicht die Temperatur von 70° C natürlich nicht zum Ausschluß der Dauerformen der Pseudomilzbrand- und sog. Futterbazillen aus. Denn die Sporen dieser Bazillen zeigen eine ähnliche Widerstandsfähigkeit gegenüber höheren Temperaturgraden wie die Milzbrandsporen. Dem Auskeimen der sog. Futterbazillen kann jedoch, wie schon die von Marxer im Auftrage Forsters ausgeführten Versuche gezeigt haben, durch Einhaltung geeigneter Temperaturen (nicht über 22° C) bei der Aufbewahrung des Gipsstabmaterials vorgebeugt werden.

Diesem Umstande habe ich bei meinen Versuchen durchweg Rechnung getragen.

II. Untersuchungen über die Sporulationsbedingungen des Milzbranderregers.

Das Material zu meinen Versuchen stammte teils von den an das hygienische Institut der Berliner tierärztlichen Hochschule erfolgten Einsendungen, teils von Versuchstieren, die ich zu diesem Zwecke mit Milzbrand infiziert hatte. Es wurden zunächst Gipsstäbe und Glas mit dem verdächtigen Material, soweit dieses noch feucht war, bestrichen. Später ließ ich das feuchte Material auch von Pappdeckelstückchen ansaugen oder bestrich nach Anfeuchtung des Pappdeckels diesen dünn mit Material („feuchter Pappdeckel"). Außerdem bestrich ich gleichzeitig die trockenen Substrate in derselben Weise. Die Objektträger wurden sowohl in dünner als auch in dicker Schicht bestrichen. Letzteres entspricht m. E. der Aufbringung des Milzbrandmaterials auf angefeuchtete poröse Substrate, da die auf den Objektträger aufgetragene dicke Materialschicht die ihr anhaftende Feuchtigkeit noch längere Zeit behält. Das eingesandte Material traf durchschnittlich 2—3 Tage nach dem Tode der Tiere im Institut ein, wurde aber teilweise noch bis

zu 8 Tagen und darüber aufbewahrt und solange zur Untersuchung herangezogen. Von den Versuchstieren wurden regelmäßig vom 1. bis zum 3. Tage, teilweise bis zum 6. Tage, Proben entnommen und zum Bestreichen der angegebenen Substrate verwandt, und zwar in erster Linie Halsvenenblut, dann Herzblut, außerdem Milzpulpa. Später habe ich auch verschiedene Kreistierärzte gebeten, bei der Obduktion in derselben Weise die ihnen zu diesem Zwecke übersandten Gipsstäbe, Objektträger und kleinen Fläschchen mit Milzbrandmaterial zu beschicken.

Die Aufbewahrung des wie oben zubereiteten Materials geschah, soweit nichts anderes bemerkt ist, nach der Straßburger Vorschrift, bei Temperaturen von 18—22° C unter Schutz vor Licht. Gewöhnlich wurde nach 1—2 Tagen die erste Untersuchung vorgenommen. Die folgenden Untersuchungen sind in immer größer werdenden Abständen bis zu ca. 280 Tagen ausgeführt worden.

Die Verarbeitung des Materials zwecks Anlegung von Plattenkulturen geschah folgendermaßen: Abkratzen des Materials oder Einbringen von Teilstücken der Substrate in physiologische Kochsalzlösung oder in Nährbouillon, öfteres kräftiges Umschütteln, ev. Filtrieren beim Vorhandensein gröberer Partikel und Erhitzung auf 65 oder 70° C während 2 und 10 Minuten, dann Anlegen von Agarplatten mit erhitztem und unerhitztem Material. Zur Anlegung von Platten mit erhitztem Material fand nur das Filtrat Verwendung. In vielen Fällen sind hiernach Milzbrandkolonien in Reinkultur aufgegangen. Häufige Verunreinigungen bildeten Kolonien der sog. Futterbazillen und Pseudomilzbrandarten. In fast allen Fällen waren aber auch dann die Milzbrandkolonien an ihrem charakteristischen Wachstum der Regel nach leicht zu erkennen. Über einen etwaigen Zweifel entschieden der Tierversuch und die Untersuchung im hängenden Tropfen.

Meine Untersuchungen erstreckten sich in erster Linie auf Material, das auf Gipsstäben aufbewahrt werden kann.

Zum Vergleich mit letzterem wurde das Bongertsche Verfahren — Eintrocknung des Materials in dicker Schicht — herangezogen. (Siehe Tabelle III.)

Die angeführten Versuche zeigen, daß auf Gips tatsächlich Sporenbildung der Milzbrandbazillen eintritt, und daß der Nachweis des Milzbrandes mit Hilfe der Gipsstäbe länger gelingt, als bei Anwendung der bisherigen Methoden, speziell des von Bongert und auch von Hosang empfohlenen Eintrocknungsverfahrens. Dies darf wohl auf den Umstand zurückgeführt werden, daß auf dem allseitig von Luft umspülten Gipsstab die für die Milzbrandbazillen antagonistischen Anaërobier prompt unschädlich gemacht werden, während dies bei der Aufbewahrung des Materials in dicker Schicht auf Objektträgern nicht so rasch der Fall ist.

Die vorangehenden Versuche allein berechtigen jedoch m. E. zu einem Vergleich der Leistungsfähigkeit der Gipsstabmethode mit der des Bongertschen Verfahrens nur insofern, als die längere Nachweisbarkeit der Milzbrandkeime auf Gipsstäben der Sporenbildung zukommt. Da letztere jedoch wie spätere Versuche zeigen werden, auch beim Bongertschen Verfahren unter Beobachtung gewisser Bedingungen ebenso wie bei der Gipsstabmethode herbeigeführt werden kann, so ist ein endgültiges Urteil über den Wert der beiden Methoden nur zu gewinnen, wenn sie unter vollkommen gleichen Bedingungen für den Eintritt der Sporenbildung angewandt werden. Wie aus den nachfolgenden Tabellen ersichtlich ist, habe ich in dieser Richtung vergleichende Versuche angestellt. Ferner habe ich außer Gipsstäben und Objektträgern auch noch andere Gegenstände zur Aufbewahrung von Milzbrandmaterial zwecks Prüfung der Nachweisbarkeit der Milzbrandkeime benutzt.

Zur Verwendung anderer Gegenstände als der Gipsstäbe und Objektträger wurde ich durch einen zufälligen Befund veranlaßt. Im Fall I der nachfolgenden Tabelle war nämlich außer Deckglaspräparaten eine Blutprobe eingesandt worden, die auf zwei Objektträgern aufgestrichen war, deren einander zugekehrte Flächen durch eine Pappdeckeleinlage getrennt wurden. Die Untersuchung dieser Probe fiel verschieden aus, je nachdem das eingetrocknete Blut von dem Objektträger allein oder gleichzeitig auch von der Pappdeckeleinlage, die einen großen Teil des Blutes angesogen hatte, abgeschabt worden war.

III. Vergleichende Untersuchungen über

nach der Gipsstabmethode und bei Aufbewahrung

1 Lfde No.	2 Tiergattung, Zeitpunkt u. Art des Todes	3 Bezeichnung und Beschaffenheit des Ursprungsmaterials zur Zeit d. Probenentnahme	4 Temperatur (° Celsius) vom Tode des Tieres bis zur Verwertung des Materials	4 nach dem Aufstreichen des Materials auf Substrate	5 Tage zwischen dem Tod des Tieres und der Sektion und der Entnahme der Versandproben	5 dem Aufstreichen des Materials auf Substrate oder der Untersuchung nach 6a u. b	5 der Untersuchung d. aufgestrichenen Materials
1	Mäuse, infolge von künstl. Infektion verendet am 8./IV. 05	Frisches Herzblut	—	19—21	0	0 0	 1 1/2
2	desgl.	Blutprobe aus dem Herzen eines in Fäulnis befindlichen Kadavers	ca. 22	19—21	1	1 1	1 ca. 2-
3	desgl.	Blutprobe aus dem Herzen eines ganz faulen Kadavers	22—23	19—21	2 1/2	2 1/2 2 1/2	2 1/2 4
4	Kuh, natürlicher Tod am 11./IV. 05	Schwach-faulige Milzstücke, die direkt nach der Entnahme aus dem Tierkörper in einem hermetisch schließenden Glase versandt worden waren	9—11 (11.-13. IV.)	18—20	1 1/2	2 1/2 2 1/2	2 1/2 4
		2 Stücke wurden unter genanntem Verschluß gelassen (α), ein Stück offen in einer Glasschale aufbewahrt (β)	20—21 (13./IV. ff)	18—20	1 1/2	3 1/4 3 1/4 3 1/4	 4 5
		Die Fäulnis des Materials schritt rasch voran, bes. bei (α)	20—21	17 1/2—20	1 1/2	4 4	 5
		Da Material (α) vollständig faul geworden war, wurde zur Untersuchung fortan nur noch Material (β) verwendet	20—21	17 1/2—20	1 1/2	5 5 5	 7 9 u.
		Auch bei β ist jetzt ziemlich erhebliche Fäulnis eingetreten	20—21	18—20	1 1/2	7 7 7	9 15 u.
		Die Fäulnis ist bedeutend fortgeschritten	20—21	18—20	1 1/2	8 8	 10 u.

Nachweisbarkeit der Milzbrandkeime

: Materials in trockener dicker Schicht.

6 Untersuchungsergebnis akterioscopischer und (b-d) kultureller Nachweis durch:				7
Deckglas-sstriche lh. Klett, lt und äbiger	b) direkt den Organteilen entnommene Proben	c) angefeuchtete Gipsstäbe, ganz dünn bestrichen	d) auf Objekt-trägern ein-getrocknetes Material	Bemerkungen
+	+ (B.)	+ (Sp.)	+ (B.) ∞	
r	∓ (B.)	– (B.) – (B.) – (Sp.)	– (B.) ∓ (B.) ∞	
∓	–	∓ (B.) ∓ (Sp.)	– (B.) ∞	
+	(B.)	(B.) + (B.) + (Sp.)	+ (B.) + (B.) ∞	
α) ± β) r	∓ (B.) ∓ (B.)	– (Sp.) + (Sp.)	+ (B.) ∞	
α) β) ?	– ∓ (B.)	β) + (Sp.)	β) – (B.) ∞	
) –	β) (B.)	β) – (B.) – (Sp.) + (Sp.)	– (B.) ∞	
–	–	∓ (Sp.) ∓ (Sp.)	– (B.). ∞	
–	–	– (Sp.)	∞	

Zeichenerklärung:

+ bedeutet den positiven, — den negativen Befund von Milzbrandkeimen, die in der Klammer beigefügten Abkürzungen: (B. = Bazillen, Sp. = Sporen) beziehen sich auf die jeweilige Untersuchung, die zwecks Beseitigung fremder Keime durch 2 bezw. 10 Minuten langes Erhitzen auf 65° C. bewerkstelligt wurde. ∞ bedeutet das Unterbleiben der Untersuchung auf Sporen. Diese Untersuchung fand bei dem auf Objektträgern eingetrockneten Material nicht statt, weil z. Z. der Untersuchungen zu Tabelle III mir noch nicht bekannt war, daß sich in diesem Material überhaupt Sporen bilden, vielmehr nach den früheren Untersuchungen angenommen wurde, daß dies nicht der Fall sei.

Aus dem nebenstehenden Versuch (Fall 4) ist ersichtlich, daß die direkt aus den Organteilen etc. angefertigten Deckglasausstriche und Kulturen (6a und b) den Nachweis von Milzbrand nicht solange gestatteten, als das Eintrocknungsverfahren und ganz besonders die Gipsstabmethode.

Dieser Versuch bestätigt auch die alte Erfahrung, daß bei Luftabschluß (Aufbewahrung in hermetisch schließenden Gläsern) die Bazillen früher zu Grunde gehen, als bei offener Aufbewahrung des Materials. Bei letzterer waren die Keime noch bis zu 8 Tagen nachweisbar, während bei ersterem Material der Nachweis schon nach 4 Tagen nicht mehr möglich war.

IV. Vergleichen

über Sporulation der Milzbrandbazillen auf Gipsstäb

1 Lfde. No.	2 Tiergattung, Zeitpunkt und Art des Todes	3 Beschaffenheit und Bezeichnung des Ursprungsmaterials z. Z. der Verarbeitung oder Untersuchung	4 Temperatur (° Celsius		5 Tage zwischen dem To des Tieres und		
			vom Tode des Tieres bis zur Verwertung des Materials	nach dem Aufstreichen des Materials auf Substrate	der Sektion oder der Entnahme der Versandproben	dem Aufstreichen des Materials auf die Substrate oder der Untersuchung	der Untersuchung d. aufgestrichenen Materials
1	Ochse, natürlicher Tod am 18./IV. 05	α) Deckglaspräparate (Oltsche Färbung)	ca. 15	16—18	1	2	—
		β) eingetrocknetes Blut zwischen 2 Objektträgern, welche durch Pappdeckeleinlage getrennt waren		16—18	1	1	2
				16—18		1	3
		γ) feuchter Blutbelag am Pappdeckel				1	5
					1	1	10 u
2	Maus, infolge von künstl. Infektion verendet am 26./IV.	Frisches Herzblut	ca. 18	18—19	0	0	—
						0	1
3	Desgleichen, verendet am 28./IV.	Herzblut	ca. 18	18—19	1/2	1/2	1
							1
4	Desgleichen, verendet am 29. IV.	Frisches Herzblut	ca. 18	18—19	0	0	C
							1
5	2 Mäuse, infolge von künstl. Infektion verendet am 6./IV. 05	α) durch physiol. Kochsalzlösung verdünntes Herzblut wurde auf Gipsstabe und Pappdeckel aufgestrichen,	15—17	ca. 20	1/4	1/4	1/
				ca. 20			1
		β) Milz, Leber und Nieren wurden zerquetscht und diese Masse (Organbrei) auf Objektträger aufgestrichen	15—17				1
6	Desgleichen, am 18./V.	α) Herzblut,					1/
		β) Organbrei je wie bei No. 5 angegeben ist	14—15 1/2	14—15 1/2	1/2	1/2	1
				14—15 1/2		1/2	1
				14—15 1/2		1/2	:
				14—15 1/2		1/2	:
				15 1/2—17		1/2	
						1/2	1
7	4 Kaninchen, infolge von künstl. Infektion verendet				1	1	
						1	
	Kaninchen I verendet 23./V.	Herzblut, Venenblut und Milz	20—21	15 1/2—19		1	

rsuche

ppdeckeln und Objektträgern in feuchtem und trockenem Zustand.

6								7
Untersuchungsergebnis a) bakterioscopischer u. (b—e) kultureller Nachweis durch								Bemerkungen
nach Klett. Olt und Rabiger	direkt den Organteilen entnommene Proben	trockene			angefeuchtete			
		Gipsstäbe	Pappdeckel	Objektträger	Gipsstäbe	Pappdeckel	Objektträger	
a	b	c	d	e	c	d	e	
) +				(β) { + (B.) ∞				
			(γ od. β?) { ∓ (B.) ∞			(γ) + (B.)		
				(β) − (B.)		(γ) + (B. u. Sp.) (γ) + (Sp.)		
+	+ (B.)		{ + (B.) (Sp.)	∼	{ + (B.) + (Sp.)			
+	+ (B.)		+ (B.) + (Sp.)	∼ ∼	+ (B.) + (Sp.)			
+	+ (B.)		+ (B.) + (Sp.)		+ (B.) + (Sp.)			
+	+ (B.)	{ +	+	+	+	+	+ { (B.)	
		{ −	−	−	+	+	+ { (Sp.)	
		{ −	−	−	+	+	+ { (Sp.)	
+	+ (B.)	{ +	+	+	+	+	+ { (B.)	
		{ −	+	+	+	+	+ { (B.)	
		{	=		-	-	{ (Sp.)	
		{ −	-	−	+	+	+ { (B.)	
		{			{ -	−	- { (Sp.)	
					{ −		{ (Sp.)	
					{		{ (Sp.)	
+	+	+	+	+	+	+	+ { (B.)	
		{ −		-	−	−	{ (Sp.)	
		{ −	−	−	+	+	+ { (Sp.)	

Allgemeine Bemerkungen: Zum Nachweis der Keimformen bei den Untersuchungen nach 6, c—e wurde das Material in der früher bereits angegebenen Weise erhitzt (s. Bem. auf Tabelle III).

Zu e, ist zu bemerken, daß recht dickes oder reichliches Aufstreichen von Material auf den Objektträger als Ersatz für die Anfeuchtung angesehen wurde, weil das dick aufgetragene Material im Innern immer noch etwas feucht blieb. Das trocken auf Objektträgern zu prüfende Material ist stets in dünner Schicht aufgetragen worden.

Sind bei einem Versuch verschiedene Zeichen (+ und —) vorhanden, so bedeutet dies, daß nicht jeder mit dem Material angestellte Versuch positiv ausfiel.

Zu 2—4 der Versuche: Der negative Ausfall bei Verwendung von Pappdeckelmaterial im Fall 2 und 4 ist darauf zurückzuführen, daß die Blutprobe zu klein war und deshalb vorzeitig eintrocknete, ehe es zur Sporenbildung kam (vgl. Fall Nr. 5).

Durch den Fall 5 wird auch erwiesen, daß in dick aufgestrichenem Material auf Objektträgern Sporenbildung eintreten kann.

Nach Fall 6 bilden sich bei einer Temperatur bis zu 15° C innerhalb 3 Tagen keine Sporen; auch die später vorgenommenen Untersuchungen fielen negativ aus.

IV. Vergleichen

über Sporulation der Milzbrandbazillen auf Gipsstäb

1 Lfde. No.	2 Tiergattung, Zeitpunkt und Art des Todes	3 Beschaffenheit und Bezeichnung des Ursprungsmaterials z. Z. der Verarbeitung oder Untersuchung	4 Temperatur (° Celsius) vom Tode des Tieres bis zur Verwertung des Materials	nach dem Aufstreichen des Materials auf Substrate	5 Tage zwischen dem To des Tieres und der Sektion oder der Entnahme der Versandproben	dem Aufstreichen des Materials auf die Substrate oder der Untersuchung nach c. a. u. b.	der Untersuchung d. aufgestrichenen Materials
8	Kaninchen II verendet 23./V.	Dasselbe Material aus schwach faulendem Kadaver	20—21	15½—19	2	2	3 5 180 298
9	Kaninchen III verendet 25./V.	Kadaver, sehr faul, Milz (α) u. Herzblut (β)	20—21	17½—19	4	4 4	7 u
10	Kaninchen IV verendet 25./V.	Kadaver, hochgradig faul, Herzblut (α), Halsvenenblut (β)	20—21	18—19	5	5 5	8 u
11	Kuh, Notschlachtung am 6./VI.	1 Stückchen Milz in beginnender Fäulnis	18—19½	18—19½	1	2 2 2	4 4 12—
		Dasselbe ziemlich faul	ca. 18—19½	ca. 20	1	3 3	3 12 18 26
12	Maus, infolge von künstl. Infektion verendet 7./VI.	Herzblut	ca. 18	ca. 18	0	0	1 3 31 18
13	2 Mäuse, infolge von künstl. Infektion verendet am 25./VI.	α) Blutmischung aus Herz und größeren venesen Gefäßen wird auf Pappdeckel und Gipsstäbe dünn aufgestrichen. β) Organbrei (cfr. 5) auf Objektträger aufgestrichen	ca. 20	19½—21	0	0	3 1 3 21
14	Kuh, notgeschlachtet am 29./XI.	Milz mit leichten Fäulniserscheinungen	Die ersten 2 Tage 8-11°, vom 3. bis zum 5. Tag 18-20°, am 6. Tag im Eisschrank (6° C.)	ca. 20	1	2½	
		Dieselbe etwas fauler			1	3½	
		Dieselbe ganz faul			1 1	6 6	8

suche

pdeckeln und Objektträgern in feuchtem und trockenem Zustand.

6 Untersuchungsergebnis a) bacterioscopischer u. (b—e) kultureller Nachweis durch								7
		trockene			angefeuchtete			
Nach Kreft, Ölt und Räbiger direkt den Organteilen entnommene Proben		Gipsstäbe	Pappdeckel	Objektträger	Gipsstäbe	Pappdeckel	Objektträger	Bemerkungen
a	b	c	d	e	c	d	e	
+	+	(B.) ⊥	⊥	⊥	⊥	+	+	
		(Sp.) —	—	—	—	—	—	
		(B.) —	—	—	—	—	+	
		(Sp.) —	—	—	—	—	—	
					— (Sp.)	— (Sp.)	— (Sp.)	
					∝	∝	+ (Sp.)	
—								
+(?)	—							
					α) —	—	— (Sp.)	
					β) ± (Sp.)	+ (Sp.)	± (Sp.)	
	—	—						
				(α u. β)	—	—	—	
+	+ (B.)							
			+ (B.)	—		+ (B.)	+ (B.)	
			+ (Sp.)		—	+ (Sp.)	+ (Sp.)	
			+ (Sp.)		—	+ (Sp.)	+ (Sp.)	
?	∓ (B.)							
						+	+	
					—	+ (Sp.)	+ (Sp.)	
					—	+ (Sp.)	+ (Sp.)	
					∝	+ (Sp.)	+ (Sp.)	
+	+							
		— (Sp.)	— (Sp.)		— (Sp.)	— (Sp.)		
		— (Sp.)	— (Sp.)		— (Sp.)	+ (Sp.)		
		— (Sp.)	— (Sp.)		— (Sp.)	+ (Sp.)		
			—			⊥ (Sp.)		
	+							
	+							
		— (Sp.)	— (Sp.)	(Sp.)	— (Sp.)	+ (Sp.)	+ (Sp.)	
		(Sp.)	— (Sp.)	(Sp.)	(Sp.)	+ (Sp.)	+ (Sp.)	
					(Sp.)	+ (Sp.)	+ (Sp.)	
					∝	+ (Sp.)	(Sp.)	
		—						
+	(B.)							
—	∓ (B.)							
	—				(Sp.)	(Sp.)	∝	

Fall 7, 8 und 9 zeigen den späteren Eintritt der Sporulation bei niedriger Temperatur (ca. 17° C), ferner, daß durch völlige Eintrocknung von Material in dünner Schicht Absterben der veget. Form in 3–5 Tagen erfolgen kann.

Versuch 8 lehrt ferner, daß die Sporenbildung auf dem Objektträger keine zufällige Erscheinung ist, sondern, wie die wiederholt ausgeführten Versuche gezeigt haben, regelmäßig eintritt, da an allen Stellen, wo Material entnommen wurde, auch Sporen nachzuweisen waren.

Bei Fall 11, 12 u. 13 ist auffällig, wie prompt die Sporenbildung auf Pappdeckel und Objekttragern eintrat, während auffallenderWeise die Gipsstäbe versagten.

Nach dem Ergebnis der übrigen vergleichenden Untersuchungen muß angenommen werden, daß hier ein Zufall obwaltete, daß vielleicht bei der Bereitung der Gipsstabe zufällig ein Desinfektionsmittel an dieselben gelangte. Diese Möglichkeit ist jedenfalls bei der Bereitung der Gipsstabe für praktische Zwecke beachtenswert.

Zu Fall 12: Zum Ausstreichen auf Objektträger reichte das Material der einen Maus nicht aus.

Im Fall 14 waren bei c und d Reinkulturen von Milzbrand gewachsen.

Durch Erhitzung dieses Materials auf 70° C während 10 Minuten erwies es sich, daß sich auf dem Pappdeckel Sporen gebildet hatten. Am Pappdeckel war das Blut beim Eintreffen der Sendung noch nicht vollständig eingetrocknet; es hatte vielmehr noch ein feuchtes Aussehen.

Angeregt durch diesen Befund stellte ich noch weitere Versuche in dieser Richtung an und zwar mit verschiedenen Materialien. Das Ergebnis dieser Versuche ist aus den Tabellen IV—VI zu ersehen.

Tabelle V.

Untersuchung über Sporenbildung der Milzbrandbazillen bei vorübergehender Aufbewahrung auf feuchten u. trocknen Substraten bei Temperaturen unter 12° C.

Lfde. No.	Beschaffenheit des Materials und der Substrate*)	Aufbewahrungsdauer a) bei durchschnittl. 10° C.	b) bei ca. 20° C.	c) im Ganzen	Untersuchungsergebnis**) Gipsstäbe	Pappdeckel	Objektträger	Bemerkungen.
1.	Blut u. Milzsaft von 2 Mäusen (getötet 24 Stunden nach künstlicher Infektion)	—	24 St. 30 „	—	Sp. ∞	— Sp.	Sp. ∞	*) Wo nichts besonderes bemerkt ist, wurde das keimhaltige Material auf **feuchten** Substraten (Gipsstäbe u. Pappdeckel) stets ganz dünn, a. d. trockenen Objektträger dagegen in ziemlich dicker Schicht aufgetragen,
2.	Dasselbe Material	24 St. 40 „ 48 „ 72 „ 24-72 St.	— — — — —	— — — — —	B. B. B. B. keine Sporen.	B. B. B. B.	B. B. B. B.	**) Sp. bedeutet, daß Sporen, B. daß **nur** Bazillen nachgewiesen wurden.
3.	Dasselbe Material auf trockene Substrate dünn aufgestrichen	40 St.	—	—	Bazillen abgestorben.			Versuch 3 zeigt, daß bei **dünnem** Aufstreichen auf Objektträgern und andern Substraten, wenn dieselben **nicht angefeuchtet** wurden, die Bazill. schon nach 40 Stunden abgestorben waren.
4.	Dasselbe Material wie No. 2	24 St. 24 „ 40 „ 48 „ 72 „	24 St. 30 „ 32 „ 32 „ 32 „	48 St. 54 „ 72 „ 80 „ 104 „	keine Sporen. Sp. Sp. Sp. Sp.	Sp. Sp. Sp. Sp.	Sp. Sp. Sp. Sp.	

Durch die vorstehend geschilderten Versuche, deren Einzelheiten aus der Tabelle IV ersichtlich sind, hat sich zunächst in Übereinstimmung mit dem Ergebnis früherer Untersuchungen die Unzulänglichkeit der Färbemethoden für den sicheren Nachweis des Milzbrands bei älterem Material gezeigt. Dies erweisen

besonders die Versuche No. 4 der Tabelle III, No. 11 und 14 der Tabelle IV wie auch No. 1, 2 und 5 der später folgenden Tabelle VI, bei denen der bakterioskopische Nachweis in dem frischen eingesandten Material durchschnittlich schon am 4. Tage versagte, während der Züchtungsversuch bei dem auf Gips oder Pappdeckel nach der Straßburger Methode aufbewahrten Material noch längere Zeit gelang.

Aber auch das von Bongert und Hosang angegebene Konservierungsverfahren des keimhaltigen Materials durch Eintrocknung auf Objektträgern in dicker Schicht stand hinter der Straßburger Methode häufig zurück, besonders dort, wo es sich um älteres Material handelte (cfr. Tabelle III, 4, Tabelle VI, 2 und 5). Und in den Fällen, in denen durch Eintrocknung in dicker Schicht der Milzbrandnachweis ebenso gut gelang wie bei dem Gipsstabverfahren und der nach dem gleichen Prinzip erfolgten Aufbewahrung des Materials auf Pappdeckel handelte es sich jedesmal um das Vorhandensein von Sporen: Es war also auch bei der Eintrocknung in dicker Schicht zur Sporenbildung gekommen. Ich werde später noch ausführlicher auf diesen Punkt zurückkommen. Vorläufig möge die Bemerkung genügen, daß in allen Fällen, in denen die für die übrigen Substrate (Gipsstäbe, Pappdeckel) gegebenen, zur Sporulation erforderlichen Bedingungen auch für die „dicke Blutschicht“ vorhanden waren, auch der Erfolg hinsichtlich der Sporenbildung der gleiche war wie bei den anderen Substraten (vgl. Tabelle IV, 7, 8, 11 und 13, sowie Tabelle VI, 1—3).

Es ist das große Verdienst der Straßburger, unter Forsters Leitung arbeitenden Schule auf die Sporenbildung der Milzbrandbazillen bei geeigneter Aufbewahrung auf Gipsstäben aufmerksam gemacht zu haben. Meine Untersuchungen haben bestätigt, daß sich der Gips in der Tat als Substrat zur Beförderung der Sporenbildung der Milzbrandbazillen ganz ausgezeichnet eignet. Es fand sich aber weiter, daß auch andere poröse Materialien bei geeigneter Anwendung den gleichen Zweck erfüllen (vgl. Tabelle IV, 3, 5, 7, 8 und Tabelle V und VI).

Nach der Straßburger Schule (l. c.) ist die Sporulation hauptsächlich von zwei Faktoren abhängig: von der Beschaffen-

heit des Nährbodens und der Höhe der Temperatur. Was zunächst den Nährboden anlangt, so stimmen die Ansichten der Autoren über die Bedeutung der Art des Nährbodens für die Sporenbildung nicht ganz mit einander überein. Buchner (22) sah in dem plötzlichen Übergang vom guten zum schlechten Nährboden die Ursache der Sporenbildung. Lehmann und Osborne (23) fanden, daß dauernd ungünstige Verhältnisse die Sporulation beeinträchtigten. Nach Schreiber (24) führt dauerndes Züchten auf guten Nährböden meist nicht zur Sporenbildung. Turrò (25) und Sobernheim (26) erzielten das am meisten sporenhaltige Material durch Bouillonaufschwemmung auf Agarplatten, Buchner auch auf gekochten Kartoffeln und auf peptonfreiem Agar. von Behring (27) setzte Kalkwasser und Calciumchlorid zur Nährbouillon hinzu, um die Sporenbildung zu begünstigen. Schmidt-Mülheim (28) hebt hervor, daß sich auch auf der Oberfläche von Fleisch, einem für die Entwicklung von Bakterien sehr günstigen Nährboden, bei geeigneter Temperatur und Feuchtigkeit Sporen bilden können. Kitt (29) beobachtete solches auf Tierhäuten bei Zimmertemperatur. Baumgarten (30) schrieb der Erschöpfung des Nährbodens einen gewissen Einfluß auf die Sporulation zu, und Forster (l. c.) erblickte in ähnlicher Weise die Ursache der Sporenbildung auf Gips hauptsächlich in dem Mangel an gutem Nährboden.

Diese verschiedenen, auf Untersuchungen mit verschiedenen Materialien gestützten Ansichten scheinen mir zu beweisen, daß die Beschaffenheit des Nährbodens im Einzelfalle von ausschlaggebendem Einfluß auf die Sporenbildung nicht ist. Bilden doch die Milzbrandbazillen nicht nur auf schlechten Nährböden, sondern ganz regelmäßig auch auf guten, in üblicher Weise verwendeten Nährböden, wie auf Nähragar, Sporen. Zierolia (31) fand, daß nur die Widerstandsfähigkeit der Sporen von Verschiedenheiten des Nährbodes abhängig ist. Nach von Behring (l. c.) ist für die Sporenbildung vor allem erforderlich, daß die Bakterien den Höhepunkt ihrer Entwicklung erreicht haben, und als weitere Bedingung zur Sporulation nennt derselbe Autor die Sauerstoffanwesenheit. „Letztere und vorherige ausreichende Ernährung des Bakteriums“ sind für ihn die Grundbedingungen

zur Sporulation. Die Angaben von Weil (l. c.), daß Sporenbildung anaërob erfolgt, hat sich ebenso wenig als richtig erwiesen, wie die später von Klett (32) aufgestellte Behauptung der Sporenbildung in einer Stickstoffatmosphäre, Slupsky (33). Die Gärtnerschen (34) Versuche haben übereinstimmend mit den Angaben von Koch und Turrò (l. c.) ergeben, daß Sauerstoff zur Sporulation der Milzbrandbazillen unbedingt erforderlich ist.

Als weiterer Faktor für das Zustandekommen der Sporenbildung ist die Feuchtigkeit erkannt worden. So wurde die von Schmidt-Mülheim (l. c.) zuerst gemachte Beobachtung, daß auf der Oberfläche von Fleisch bei entsprechender Feuchtigkeit Sporenbildung eintritt, von Johne (l. c.) dahin ergänzt, daß nach dem Eintrocknen der Fleischoberfläche niemals Sporenbildung zustande kommt. Ferner hebt von Esmarch (35) hervor, daß nicht nur die Sporenbildung überhaupt, sondern auch die Zeit des Eintritts der Sporenbildung von dem Grade der vorhandenen Feuchtigkeit abhängig ist. Bei absichtlicher Feuchthaltung von Hautstückchen trat die Sporenbildung prompt in 24 Stunden ein. Waren vor Ablauf von 24 Stunden die Hautstückchen eingetrocknet, so wurde niemals Sporenbildung beobachtet. Durch Schnitte stellte sodann von Esmarch fest, daß die Sporenbildung bei Hautstücken an Milzbrand verendeter Tiere nur an der Oberfläche stattfand und niemals in den tieferen Schichten. Forster läßt den Gipsstab vor dem Bestreichen anfeuchten, und Jakobsthal und Pfersdorff (l. c.) erblicken in der Eintrocknung des Materials eine große Gefahr für das Leben der Milzbrandbazillen. Der Anfeuchtung des Substrats bedarf es vor allem bei nicht hygroskopischen Körpern, um Sporenbildung zu ermöglichen. Nach meinen Untersuchungen muß ich von Esmarch zustimmen, wenn er die Feuchtigkeit als das erste Erfordernis für das Eintreten der Sporulation bezeichnet. Die günstigen Resultate der Sporenbildung auf Gipsstäben sind m. E. vor allem der nach Vorschrift erfolgenden Anfeuchtung der Gipsstäbe zuzuschreiben.

Daß aber auch der Temperatur eine entscheidende Rolle bei der Sporenbildung zukommt, ist durch zahlreiche Versuche

dargetan. Über das Temperaturoptimum für die Sporenbildung gehen die Angaben auseinander. Nach den Versuchen von Weil (l. c.) ist eine Temperatur von 30—37° C am geeignetsten. Robert Koch (36) legt das Temperaturoptimum zwischen 20 und 25° C, Sobernheim (l. c.) zwischen 32 und 35° C. Nach Günther (37) liegt dasselbe bei 28, nach Kitt und Baumgarten (l. c.) bei 30 und nach Schreiber (l. c.) bei 34° C. Forster betrachtet als die geeignetste Temperatur für die Sporenbildung der Milzbrandbazillen speziell bei Gipsstäben eine solche von 18—22° C. Auch über die untere Grenze gehen die Angaben weit auseinander. Nach Weil hört bei 12°, nach Schreiber bei 14°, nach Kitt und Baumgarten bei 18° C die Sporenbildung auf. Die Zeitdauer der Sporenbildung hängt gleichfalls von der herrschenden Temperatur ab, wie Weil durch seine Versuche festgestellt hat. Bei allen diesen Angaben ist zu beachten, daß die Bedingungen des Eintritts der Sporenbildung bei einzelnen Stämmen verschieden sein können, Sobernheim (l. c.).

Dem Tageslicht wird ein schädigender Einfluß nicht nur auf die vegetativen Milzbrandformen, sondern auch auf die Sporen zugeschrieben. Nach Momont (l. c.) gehen Milzbrandbazillen je nach der Dicke der Schicht, in der sie sich befinden, in $6^1/_2$—15 Stunden bei Sonnenbelichtung zugrunde, Sporen dagegen widerstehen der Belichtung mehr als 100 Stunden. Arloing (38) und Roux (39) fanden, daß die Sporen bei Lichteinwirkung leichter keimfähig bleiben, als sporenfreie Bazillen. Auf Agarplatten tritt nach Dieudonné (40) in $3^1/_2$ Stunden Absterben der Sporen, in $1^1/_2$ Stunden dagegen Absterben der Bazillen ein. Aus mehreren Versuchen glaubte von Esmarch schließen zu müssen, daß schon gedämpftes Tageslicht die Sporenbildung verhindert. Jakobsthal und Pfersdorff (l. c.) schreiben nur der stärkeren Lichtwirkung oder Wärmestrahlung einen schädigenden Einfluß auf die Milzbrandbazillen zu.

Soweit die Angaben der Literatur.

Was zunächst die Frage der Bedeutung des Aufbewahrungssubstrats anbetrifft, so haben die von mir angestellten Ver-

suche ergeben, daß dem Aufbewahrungsmaterial für die Sporenbildung keine ausschlaggebende Bedeutung beizulegen ist. Denn es bildeten sich Sporen bei Aufbewahrung des Milzbrandmaterials auf Glasplatten und Pappdeckelstücken, ebenso wie auf Gips. Wenn ein Aufbewahrungssubstrat manchmal versagte, so lag dies nach den im allgemeinen gewonnenen Ergebnissen nicht an der Beschaffenheit des Substrats, sondern an dem Fehlen von genügender Feuchtigkeit oder Wärme oder an der Keimarmut der zum Nachweis verwandten Proben.

Hinsichtlich der für die Sporenbildung geeignetsten Temperatur habe ich bei meinen Untersuchungen beobachtet, daß bei einer Temperatur unter 15° C Sporenbildung nicht mehr eintritt. In voller Übereinstimmung mit Marxer fand ich als die geeignetste Temperatur eine solche von ca. 20° C. Waren die bestrichenen Materialien längere Zeit einer niedereren Temperatur ausgesetzt und kamen sie, solange die Substrate noch feucht waren, in günstige Temperaturbedingungen, so trat die Sporenbildung noch bis zum 4. Tage ein (vgl. Tab. V). Wenn das bei niederer Temperatur versandte Material noch nicht vollständig vertrocknet war, so vermochte der Eintritt geeigneter Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnisse die noch nicht abgestorbenen Bazillen stets noch zur Sporulation zu bringen.

Die über die Notwendigkeit der Feuchtigkeit für die Sporenbildung der Milzbrandbazillen von mir angestellten Versuche haben insbesondere ergeben, daß Sporulation bei sonst vollkommen gleichen Bedingungen nur auf den feuchten, nie aber auf den vollkommen trokenen Substraten eintritt.

Bei Gips konnte eine dem Substrate mangelnde Feuchtigkeit nicht einmal durch dickeres Aufstreichen des Materials ersetzt werden. Dagegen war dies bei dem weniger porösen Pappdeckel und bei den Glasplatten der Fall (vgl. Tab. IV, 1, 5, 6, 7, 8, 11, 12 u. a. m.). Erklärt wird letzterer Umstand durch die dem keimhaltigen Material sich erhaltende Feuchtigkeit, die bei dem weniger porösen Pappdeckel und bei Glas genügt, um eine vorzeitige Eintrocknung des Materials zu verhindern. Der stark poröse Gips saugt im trockenen Zu-

stande dagegen die Feuchtigkeit gleichmäßig und rasch auf, wodurch sich eine vorzeitige Eintrocknung des oberflächlich aufgestrichenen Materials erklärt. Es ist daher bei Gips, wie Forster mit Nachdruck betont hat, darauf zu achten, daß er vor Aufbringung des keimhaltigen Materials hinreichend mit Wasser gesättigt ist. Das gleiche ist bei dünnem Aufstreichen von Material auf Pappdeckel zu beachten. Ich fand, daß die Sättigung der umgebenden Luft mit Wasserdampf nicht genügt, um bei trockenem Material Sporulation zu bewirken.

Günstig dagegen wurde die Sporulation beeinflußt, wenn statt des Wassers zur Anfeuchtung der Substrate 0,7—1% ige Kochsalzlösung verwendet wurde. Einmal habe ich auch Pappdeckelstreifen teils mit Nährbouillon, teils mit Kochsalzlösung angefeuchtet und dann sterilisiert. Die in noch feuchtem Zustand befindlichen Streifen wurden kurze Zeit später mit bazillenhaltigem Material beschickt. Es stellte sich bei beiden Nährsubstraten reichliche Sporenbildung ein. Wesentliche Unterschiede wurden jedoch hinsichtlich des Eintritts der Sporulation nicht beobachtet. Allerdings muß ich zugeben, daß es mir bei meiner damaligen Untersuchung weniger darauf ankam, in welcher Zeit die Sporulation eintrat, als darauf, in welchem Umfange dieselbe erfolgte.

Was den Einfluß der Lichteinwirkung auf die Sporulation der Milzbrandbazillen anbelangt, bin ich gegenüber früheren Angaben zu abweichenden Resultaten gelangt. Ich habe von der Lichteinwirkung auf die Sporenbildung der Milzbrandbazillen in Blut oder Organbrei keine Nachteile gesehen. Jedoch muß ich bemerken, daß bei meinen Versuchen, die ich während der Wintermonate anstellte, meistens nur diffuses Tageslicht in Frage kam. Das Nähere ist aus der Tabelle VI ersichtlich.

Bemerkt sei, daß bei den Versuchen über die Einwirkung des Lichts auf die Sporenbildung der Milzbrandbazillen die frisch bestrichenen Gipsstäbe und die übrigen Substrate tagsüber am Laboratoriumsfenster bei einer Temperatur von 20 bis 22° C aufgestellt und vor beginnender Dämmerung in den Kühlraum (Temperatur von 6—7° C) verbracht wurden, sodaß

eine Sporenbildung während der Nachtzeit (Dunkelheit) ausgeschlossen war. Die Substrate waren nur auf der dem Lichte zugekehrten Seite mit keimhaltigem Material bestrichen worden. Zu den Versuchen wurde Milzbrandbazillen enthaltendes Material auf Gipsstäben, Pappdeckelstücken und Agarplatten, außerdem auch Material, das in Kochsalzlösung aufgeschwemmt war, verwandt. (Siehe Tabelle VI.)

Überall ist bei den in Tabelle VI verzeichneten Versuchen Sporenbildung eingetreten, auch bei den durchscheinenden Substraten (Agarplatten und Aufschwemmungen in Kochsalzlösung). Zur Kontrolle waren die gleichen Substrate durch geeignete Umhüllung vor Licht geschützt unter sonst gleichen Bedingungen aufbewahrt worden. Hierbei ergab sich kein Unterschied in der Sporenbildung. Mithin dürfte diffuses Tageslicht keinen hemmenden Einfluß auf die Sporulation der Milzbrandbazillen in Blut oder Organbrei bis zu dreitätiger Einwirkung ausüben.

Es bleiben somit als Erfordernisse für die Sporenbildung der Milzbrandbazillen nur bestehen:

1. Feuchtigkeit,
2. Sauerstoff,
3. eine bestimmte Temperatur.

Auf Grund meiner Beobachtungen komme ich mithin zu dem Schluß, daß die Konservierung milzbrandkeimhaltigen Materials am besten durch Bestreichen feuchter Substrate mit dem Material erzielt werden kann. So gelingt der Nachweis auf jeden Fall, entweder infolge der eintretenden Sporulation oder infolge der Konservierung der vegetativen Formen durch den mäßigen Feuchtigkeitsgehalt des Substrats. Das Ausstreichen des Materials ist wesentlich, da nach dem Ergebnis der zahlreichen früheren Versuchen in nicht ausgestrichenem Blute die Milzbrandbazillen durch den Antagonismus der Fäulnisbakterien in verhältnismäßig kurzer Zeit zerstört werden können.

Wenn Bongert und Hosang mit der Eintrocknung in dicker Schicht hinsichtlich der Konservierung des keimhaltigen Materials günstige Ergebnisse erzielt haben, so scheint mir aus

VI. Einwirkung des diffusen Tageslich

1 Lfde. No.	2 Tiergattung, Zeitpunkt und Art des Todes	3 Beschaffenheit und Bezeichnung des Ursprungsmaterials z. Z der Verarbeitung oder Untersuchung	4 Temperatur (° Celsius) vom Tode des Tieres bis zur Verwertung des Materials	4 nach dem Aufstreichen des Materials auf Substrate	5 Tage zwischen dem Tod des Tieres und: der Sektion oder der Entnahme der Versuchsproben	5 dem Aufstreichen des Materials auf Substrate od. der Untersuchung von 6a und b	5 der Untersuchung d. aufgestrichenen Materials
1.	Rind, natürlich. Tod am 6./XII. 05	α) Milz- und Halsvenenblut je in ein. Gläschen	7—9°	7—12°	1	2	. . .
		β) dünn bestrichener Objektträger				1	2
		γ) Blut, an Zeitungspapier haftend	vom 3. Tag nach dem Tod des Tieres an 18—19° C.			3	. .
		δ) dick bestrichene Gipsstäbe, ziemlich trocken bei Ankunft im Laboratorium				1	3
1a.		Probe aus α) zum Bestreichen feuchter Substrate (Verwendung fanden Gipsstäbe, Pappdeckel u. Objektträger)	18 -19°	ca. 20°	1	4 4	 7 16 28 42
2.	Kuh, natürlich. Tod am 10./XII.	α) Ein Stückchen Milz von normalem Aussehen	ca. 8°		1/2	1 1/2	. .
		β) Ein Stück vom Duodenum, das stark geschwollen und blutig imbibiert ist				1 1/2	.
			vom 3. Tag nach dem Tod des Tieres an 15 -18°	ca. 20°	1/2	2 1/2	. .
					1/2	2 1/2	4
						4	. .
						4	10
		Material β) in sehr faul. Zustand	vom 3. Tag an 15—18°	ca. 20°	1/2	6 6	. . 8
		Dasselbe	vom 3. Tag an 15—18°	ca. 20°	1/2	8 8	. . 12
		Dasselbe	vom 3. Tag an 15—18°	ca. 20°	1/2	11 (!)	16

die Sporulation der Milzbrandbazillen.

6 Untersuchungsergebnis (a) bakterioskopischer und (b–e) kultureller Nachweis durch:								7
a)	b)	der Einwirkung des Tageslichts ausgesetzte			vor Tageslicht geschützte			Bemerkungen
ckglas-sstriche, rbt nach . Klett und abiger	direkt den Organteilen entnommene Proben	Gipsstäbe c	Pappdeckel d	Objektträger e	Gipsstäbe c	Pappdeckel d	Objektträger e	
—	— (B.)							
. . . .	. . . . .	(B.) / (Sp.)	(β–δ)		—	+	+	
(?)	+ (B.)							
. . . .	. . . . .	(β–δ)	(B.) / (Sp.)		—	—	—	
—	∓ (B.)							
		(Sp.) +	+	+	+	+	+	
		+	+	+				
		—	—	↘				
		+	+	∞				
—	—							
+	—							
—	—							
+ (?)	+							
		(Sp.) α	—	—				
		(Sp.) β +	+	+	+	+	+	
-	—							
(?)	—							
		(Sp.) α	—	—				
		(Sp.) β +	+	·				
(?)	—							
		+ (Sp.)	+ (Sp.)	∞				
—	—							
		+ (Sp.)	∓ (Sp.)	∞				
		+ (Sp.)	+ (Sp.)	∞				

Zu Fall 1.

Bei dem eingesandten Material β, γ und δ (Rubrik 4) waren schon nach 3 Tagen keine Keime mehr nachzuweisen, (Ursache: Eintrocknung), dagegen erwies sich das Ursprungsmaterial (α) nach 4 Tagen noch als keimfähig. Durch Einwirkung des diffusen Tageslichts wurde der Sporulationsvorgang nicht gestört.

Die vom Pappdeckelmaterial herrührenden Agarplatten waren weniger durch fremde Keime verunreinigt, als die Gipsplatten.

Die Sporen behielten ihre Lebensfähigkeit noch nach einer Lichteinwirkung von 42 Tagen (vgl. No. 1a).

Fall 2 ist dadurch bemerkenswert, daß in der Milz keine Keime nachgewiesen werden konnten, während dies im Darmstück noch nach 11 Tagen möglich war.

VI. Einwirkung des diffusen Tageslich

1	2	3	4		5		
			Temperatur (° Celsius)		Tage zwischen dem Tod des Tieres und:		
Lfde. No.	Tiergattung, Zeitpunkt und Art des Todes	Beschaffenheit und Bezeichnung des Ursprungsmaterials z. Z. der Verarbeitung oder Untersuchung	vom Tode des Tieres bis zur Verwertung des Materials	nach dem Aufstreichen des Materials auf Substrate	der Sektion oder der Entnahme der Versandproben	dem Aufstreichen des Materials auf Substrate od. der Untersuchung von 6a und b	der Untersuchung d. aufgestrichenen Materials
3	2 Mäuse, infolge von künstl. Infektion verendet am 12./XII. 05	α) Frisches Herzblut u. Organbrei mit physiol. Kochsalzlösung verdünnt und vor dem Aufstreichen auf die Substrate filtriert		ca. 20°	0	0	0
						0	2½
		β) verdünnte Blutlösung im Reagenzröhrchen, dem Tageslicht ausgesetzt				0	2½ Ma
						0	18
						0	30
						0	40
4	Sporenfreie Milzbrand-Agarkultur vom 15./XII. 05.	2 Agarplatten m. sporenfreien Kolonien werden bei ca. 20° C. 24 Stunden					
		α) der Tageslichteinwirkung ausgesetzt	—	ca. 20°			1 T
		β) vor Licht geschützt aufbewahrt					
5	Rind, an natürlichen Milzbrand gestorben am 27./XII. 05	α) 1 Stück Ohr			1	2	. .
		β) Blut in Gläsern		?	1	1	2
		γ) bestrichene Gipsstäbe	zuerst 2—3°, vom 3. Tag an ca. 18–20°		1	1	2
		δ) Blut an Zeitungspapier anheftend		vom 3. Tag an ca. 20°	1	1	3
		ε) dickbestrichener Objektträger		ca. 20°	1	2	5
		(γ—ε s. unter Rubrik 6c—e.)					
		Aus Probe α—β wurden Gipsstäbe, Pappdeckel u. Objektträger in üblicher Weise bestrichen, das Material war schon ziemlich faul	18—20°	ca. 20°	1	4	. .
						4	6
		Das Material war schon sehr faul		ca. 20°	1	5	. .
						5	8
					1	6	. .
						6	8
		Das Material ist ganz faul geworden		ca. 20°	1	7	. .
						7	1
		Dasselbe Material		ca. 20°	1	8 (!)	1

f die Sporulation der Milzbrandbazillen.

6								7
Untersuchungsergebnis (a) bakterioskopischer und (b—e) kultureller Nachweis durch:								
a) eckglas-sstriche. irbt nach , Klett und äbiger	b) direkt den Organteilen entnommene Proben	der Einwirkung des Tageslichts ausgesetzte			vor Tageslicht geschützte			Bemerkungen
		Gipsstäbe c	Pappdeckel d	Objektträger e	Gipsstäbe c	Pappdeckel d	Objektträger e	
								Die Untersuchung bei 6, a und b bezieht sich stets auf den Bazillengehalt des Untersuchungsmaterials, außer bei Fall 3, β, wie dies besonders angegeben ist; bei 6, c—e ist jedesmal angegeben, ob Bazillen oder Sporen in Frage kommen,
								Zu den Versuchen 1a bis 5: Die Sporenbildung hat sich meist schon nach 24 Stunden in allen Fällen dieser Versuchsreihe vollzogen, sodaß die Dauer der Erhaltung der Lebensfähigkeit der Milzbrandbazillen, die der Einwirkung des Lichtes ausgesetzt sind, noch nicht genau angegeben werden kann.
aterial aus α u. β, Laboratorium ausgestrichen)		*) +	*) +	+	+	+	+ (Sp.)	**Zu Fall 5:** *) Ganz enormes Wachstum, meist in Reinkultur.
								Vom 5. Tage an erwuchsen Schwierigkeiten beim Nachweis insofern, als sich eine gewisse Bazillenarmut des Materials geltend machte.

meinen Versuchen hervorzugehen, daß bei diesem Verfahren die in der Tiefe des Materials ziemlich lange anhaltende geringe Feuchtigkeit und auch die dabei zweifellos erfolgende Sporenbildung eine Rolle spielen (vgl. Tabelle IV, Versuch 1, 5 und 6 in Verbindung mit den Versuchen 7, 8, 11 und 13).

In allen meinen Versuchen hat sich nie ein Fall gefunden, in dem eingetrocknetes Material, das älter als 8 Tage war, durch Erhitzen auf 70° C ein negatives Resultat ergab, wenn es schon unerhitzt positiv ausgefallen war. Hätte es sich nur um konservierte Milzbrandbazillen gehandelt, wäre dieses sicherlich einmal zu erwarten gewesen.

Aber auch zugegeben, daß sich bei der Eintrocknung in dicker Schicht wirklich die angegebene Tenazität der Bazillen bis zu etwa 150 Tagen erstreckt, so muß eine derartig lange Erhaltung des Lebens der Bazillen, die im übrigen für die Nachprüfung der Milzbranddiagnosen ohne Belang ist, als Ausnahmefall aufgefaßt werden. Die meisten Autoren stimmen darin überein, daß die Bazillen des Milzbrands durch Eintrocknung meistens sehr bald zugrunde gehen. Nach Koch (l. c.) kann sich der Milzbrandbazillus in dauernd trocknem Zustande nur kurze Zeit lebensfähig erhalten. Momont gibt als längste Dauer der Lebensfähigkeit der Bazillen 57 Tage an, Kitt 60 Tage, und Friedberger und Fröhner (41) bemessen sie auf 1—35 Tage. Nach Abel und Froitzky (42) schwankt die Lebensdauer der Milzbrandbazillen zwischen 14 und 37 Tagen. Ich selbst konnte — und ich habe sehr viele Untersuchungen nach dieser Richtung hin vorgenommen — bei rascher und vollständiger Eintrocknung eine länger als 8 Tage dauernde Lebensfähigkeit der Milzbrandbazillen niemals nachweisen.

Die Straßburger Schule hält den Gipsstab hauptsächlich deswegen für den Versand milzbrandverdächtigen Materials zwecks bakteriologischer Feststellung der Diagnose für vorteilhaft, weil sich auf ihm rasch und sicher die Sporenbildung vollzieht. Diese Angabe der Straßburger Schule ist durch meine Versuche vollkommen bestätigt worden. Daneben haben aber meine Untersuchungen gezeigt, daß auch auf anderen Substraten bei geeigneter Verwendung ebenso wie beim Gipsstab Sporen-

bildung eintritt. Deshalb fragt es sich, welches der einzelnen Substrate für die Praxis am meisten zu empfehlen ist.

Die Verwendung von Pappdeckelstückchen — selbstverständlich von solchen, die noch nicht mit Desinfektionsmitteln in Berührung gekommen sind, also am besten von ungebrauchten, direkt aus der Fabrik stammenden Stücken — hat meines Erachtens verschiedene Vorzüge vor der Verwendung von Gipsstäben:

Erstens ist Pappdeckel überall leicht und bequem zu beschaffen. Der Gipsstab dagegen muß stets vorrätig gehalten werden, da die Anfertigung desselben mit einigen Umständlichkeiten verknüpft ist.*)

Zweitens ist die Entnahme keimhaltigen Materials aus dem Tierkörper mit dem biegsamen Pappdeckel leicht zu bewerkstelligen, jedenfalls so leicht, wie mit dem Gipsstab, und leichter, als das Bestreichen von Objekträgern mit Milzbrandmaterial. Bei Verwendung von Pappdeckelstreifen käme es auch wegen ihres geringen Wertes und der bequemen Hantierung auf eine mehr oder weniger große Anzahl von Entnahmestellen nicht an.

Drittens kann die Signierung der Probe durch Bleistift vor der Entnahme an einem nicht zu bestreichenden Teile des Pappdeckels selbst geschehen.

Viertens ist auch der Versand einfach zu bewerkstelligen. Die beschickten Pappdeckelstücke können wie die Gipsstäbe in einem mit Watte verschlossenen Reagenzglase mit der vorgeschriebenen Blech- und Holzumhüllung sofort versandt werden.

Endlich läßt sich die Verarbeitung im Laboratorium rasch, leicht und vor allem ungefährlich erledigen. Man kann die Pappstückchen mit einer Schere nach Fixierung mit einer Pinzette sehr bequem zerkleinern und in die Nährbouillon oder Kochsalzlösung zwecks Erhitzung auf 70° C einbringen. Das Abschaben der Gipsstäbe und Objektträger ist demgegenüber mehr zeitraubend und umständlich und schließt auch eine Verstreuung der Keime nicht aus. —

*) Gipsstäbe nach Vorschrift von Jakobsthal und Pfersdorff werden seit neuerer Zeit von Lautenschläger in Berlin in gebrauchsfertigem Zustande vorrätig gehalten.

Sollte für die Praxis an Stelle des Gipsstabes Pappdeckel gewählt werden, so würde sich nach Maßgabe der sorgfältig bearbeiteten Straßburger Vorschriften folgendes Verfahren empfehlen:

1. Bezeichnung der Probe: Ein ca. 5 cm langer und ca. 1 cm breiter, vorher mit Nährbouillon oder Kochsalzlösung angefeuchteter und sterilisierter Pappdeckelstreifen in Reagenzgläschen, die am Boden mit Watte versehen und mit einem Wattepfropf verschlossen sind, wird an einem Ende signiert;
2. Entnahme der Probe: Man erfaßt das mit reinem Wasser zuvor leicht angefeuchtete Stück an dem beschriebenen Teil und bestreicht das andere Ende mit der gewünschten Probe, indem man leicht über die betreffende Entnahmestelle wegstreicht oder dort Blut ansaugen läßt;
3. Verpackung zum Versand: Die bestrichenen Stückchen werden in Reagenzgläsern mit passender Holzumhüllung versandt. Es ist darauf zu achten, daß die einzelnen Stückchen genügend freien Raum behalten und nicht aufeinander gedrückt werden (Sicherung des Sauerstoffzutritts). Bei niederer Außentemperatur transportiert man die Versandgläser bis zur nächsten Poststation am besten in der Brusttasche. Im Laboratorium werden sie ungefähr 1 Tag lang bei Zimmertemperatur (18—22° C) gehalten;
4. Untersuchung: Die Stückchen bringt man je nach Vorrat ganz oder geteilt in Nährbouillon oder Kochsalzlösung, erhitzt nach kräftigem Umschütteln einen Teil 2 Minuten lang auf 65° C und den anderen Teil 10 Minuten lang auf 70° C. Nach dem Erhitzen wird jedesmal sofort abgekühlt. Ist wenig Material aufgestrichen gewesen, so wird die ganze Aufschwemmung für die erste Platte verwandt; davon werden 3—5 Ösen für die zweite und ebensoviel von der zweiten für die dritte Platte entnommen. Ist dagegen viel Material aufgetragen, so genügt ein Bruchteil der vorher kräftig umgeschüttelten Aufschwemmung für die erste Platte. Sollte die Sporenbildung nach einem Tage noch nicht eingetreten sein, so bewahrt man die eingesandten Proben noch 1—2 Tage länger bei 20° C, indem man die Substrate gleichzeitig feucht erhält.

Daß bei Kadavern, die uneröffnet gelegen haben, als Entnahmestelle der Proben distale Blutgefäße zu wählen sind, versteht sich nach unseren jetzigen Kenntnissen über die Zerstörung der Milzbrandbazillen im Körper des toten Tieres durch die sog. Kadaverbazillen von selbst. In Fällen, in denen selbst die üblichen distal gelegenen Entnahmestellen (Kitt, Bongert, Kaestner) ein günstiges Resultat für die bakteriologische Prüfung nicht mehr erwarten lassen, ist das Augen-

merk auf das Vorhandensein von Blut auf der Oberfläche und in Umgebung des Kadavers zu richten (Blut, das aus natürlichen Körperöffnungen ausgeflossen und eingetrocknet ist). Von Bedeutung für die Entnahme der Proben ist endlich auch, worauf Carl (43) hingewiesen hat, daß dieselbe möglichst steril geschieht.

Im übrigen sei bemerkt, daß nach den Untersuchungen, die mit fauligen Kadavern milzbrandkranker Tiere von Professor Ostertag im hygienischen Institut angestellt worden sind, die distalen Venen aus den Extremitäten viel länger unversehrte Milzbrandbazillen enthalten, als die Ohrvenen oder gar die Jugularvenen.

Das Gesamtergebnis meiner Untersuchungen fasse ich in folgende

Schlußsätze

zusammen:

1. Die Straßburger Gipsstabmethode ist zum Versand von Milzbrand- und milzbrandverdächtigem Material zwecks bakteriologischer Feststellung des Milzbrandes sehr geeignet.
2. Der Vorteil des Verfahrens beruht darauf, daß es bei Befolgung des von Forster und seinen Schülern angegebenen Verfahrens möglich ist, die Milzbrandbazillen auf den Gipsstäben zur Sporulation zu bringen.
3. Auch auf anderen Substraten (Pappdeckel insbesondere), die nach dem Straßburger Verfahren behandelt werden, tritt Sporulation der Milzbrandbazillen ein.
4. Die Überlegenheit des Gipsstabverfahrens (und der mit anderem befeuchtetem porösem Material arbeitenden Modifikationen) gegenüber der Eintrocknung des Milzbrandmaterials in dicker Schicht, beruht darauf, daß bei jenem sofort nach dem Aufstreichen milzbrandkeimhaltigen Materials in dünner Schicht der schädigende Einfluß der Anaërobier gehemmt oder beseitigt wird, während bei der Eintrocknung in dicker Schicht dies nur in der oberflächlichsten Schicht der Fall ist. Dazu

kommt noch bei dem Gipsstabverfahren (und den oben erwähnten Modifikationen) die Gelegenheit besserer Sauerstoffumspülung als ein weiterer die Sporulation der Milzbrandbazillen begünstigender Faktor.

5. Für das Zustandekommen der Sporulation können als unbedingt erforderliche Bedingungen nur gelten: die Anwesenheit von Sauerstoff, das Vorhandensein eines bestimmten Maßes von Feuchtigkeit und eine bestimmte Temperatur.
6. Fehlt die erforderliche Temperatur, wie während des Transportes der Proben in den Monaten November bis April, so verlieren die Bazillen trotzdem ihre Fähigkeit, zu Sporen auszukeimen, nicht, wenn das Substrat genügend feucht erhalten wird. Die Sporulation kann bei hinreichgender Feuchtigkeit des Materials noch nach Verlauf von mehreren Tagen einsetzen, wenn es genügender Wärme (ca. 20° C) ausgesetzt wird.
7. Diffuses Tageslicht übt auf die Sporulation von Milzbrandbazillen in Blut oder Organbrei bei 1—2 tägiger Einwirkung keinen schädigenden Einfluß aus.

Literaturverzeichnis.

1. Johne, Sächs. Jahresberichte.
2. Lüpke, Berl. Tierärztl. Wochenschrift 1900, S. 495.
3. Fränkel, Hygien. Rundschau 1901, No 13.
4. Bongert, Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. 1902, S. 193. Zentralbl. f. Bakt. 1903. Org. Bd. XXXIV u. XXXV.
5. Kaestner (früher Kaesewurm), Zeitschr. für Fleisch- u. Milchhyg. Jahrg. 1904, Heft 5 und 6.
6. Ostertag, ibid. Jahrg. XIII.
7. Tröster, Zeitschr. f. Vet.-Kde. 1899, Januarheft.
8. Kostjurin und Krainsky, Zentralbl. f. Bakter. Bd. X.
9. Olt, Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 1899, No. 1.
10. Hosang, Archiv f. wissenschaftl. u. pract. Tierheilk. 1902, Heft 3 u. 4.
11. Fischöder, Fortschr. f. Vet.-Hyg. I. Jahrg, Heft 1 ff.
12. Marxer, Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. 1905, Heft 5.

12a. Jakobsthal und Pfersdorff, Zeitschr. f. Infektionskrankheiten, parasitäre Krankh. u. Hygiene d. Haustiere I. Bd., 2. Heft.

13. Engel, Thèse de la Facult. des sciences. Paris 1872.
14. Weil, Archiv f. Hyg. 1899.
15. Toussaint, De l'immunité.
16. Pasteur, Chamberland et Roux, De l'atténuation des virus etc. Compt rend., Tome XCII.
17. Momont, Annal. de l'Institut Pasteur, 1892.
18. Koch u. Wolffhügel, Mitteil. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt 1881.
19. R. Koch, Gaffky u Löffler, ibid. 1884.
20. Geppert, Deutsche Medizinische Wochenschrift 1891.
21. Pfeiler, Zeitschr. f. Infektionskrankheiten, parasitäre Krankh. u. Hygiene der Haustiere I. Band, Heft 2—3.
22. Buchner, Zentralbl. f. Bakter. etc. I. Abt. Bd. VII. 1890.
23. Lehmann, Münch. Med. Wochenschr. 1890. — Osborne, Archiv f. Hyg. Bd. XI.
24. Schreiber, Zentralbl. für Bakteriol. etc. I. Abt. Bd. XX. 1896.
25. Turrò, ibid. Bd. XXVIII und XXXII.
26. Sobernheim, Milzbrand, Handb. d. pathog. Mikroorg. von Kolle-Wassermann Bd. II.
27. v. Behring, Zeitschr. f. Hyg. 1889 und Deutsche Med. Wochenschr. 1899.
28. Schmidt-Mülheim, Archiv f. animal. Nahrungsm. Bd. IV. 1890.
29. Kitt, Bakterienkunde u. pathol. Mikrosk. 1903.
30. Baumgarten, Lehrb. d. path. Mykologie Bd. II; Jahresbericht über d. Fortsch. in d. Lehre v. d. path. Mikroorg. Jahrg. I—III.
31. Zierolia, Baumgarten's Jahresberichte. 1902.
32. Klett, Zeitschr. f. Hygiene etc. Bd. XXXIV, Heft 3.
33. Slupski, Zentralbl. f. Bakt. Orig.-Bd. XXX. 1901.
34. Gärtner, Festschrift zu Rob. Kochs 60jährigen Geburtstag.
35. v. Esmarch, ibid. und Zeitschrift f. Hygiene. 1889.
36. Koch, Mitteilungen aus dem Kaiserl. Ges.-Amt. Bd. I.
37. Günther, Art. „Milzbrand" im Handb. d. pathog. Mikroorg. Bd. II. 1903.
38. Arloing, Compt. rend. de l'Acad. Tome CXIV. 1892.
39. Roux, Annal. de l'Institut Pasteur. Bd. VI. 1890.
40. Dieudonné, Arbeiten a. d. Kaiserl. Ges.-Amt. 1894.
41. Friedberger u. Fröhner, Bd. II. 1892. pag. 731.
42. Abel, Zentralbl. f. Bakteriol. etc. Bd. XVIII, Heft 5.
43. Carl, Deutsche Tierärztliche Wochenschrift. 1903.

Lebenslauf.

Am 26. April 1872 wurde ich, Wilhelm Reinhold Eberle, als Sohn des damaligen Oberstabsarztes G. Friedr. Eberle in Ulm a. D. geboren. Meine Gymnasialzeit vom Jahre 1880—1890 verbrachte ich an den Gymnasien Hall und Ulm und an den evangelisch-theologischen Seminarien zu Schönthal und Urach in Württemberg. Vom Jahre 1890 ab studierte ich Tierheilkunde und Medizin in Stuttgart und Gießen.

Die tierärztliche Approbation erlangte ich im Anfang des Jahres 1896 und wurde bald darauf als Assistent an der chirurgischen Klinik der Tierärztlichen Hochschule zu Stuttgart angestellt.

Gegen Ende des Jahres 1897 wurde mir die Stelle eines staatlich subventionierten Tierarztes in Höchst i. O. übertragen, und im Jahre 1900 begründete ich im Landkreis Wiesbaden eine neue Praxis. Seit Februar 1905 beschäftige ich mich mit Unterbrechungen als Volontärassistent in dem hygienischen Institut an der Tierärztlichen Hochschule zu Berlin. Zur Zeit bin ich in Dresden praktisch tätig.